

**EDUARDO ARNAUT DOS SANTOS LIMA**

**PARÂMETROS SEMINAIS PARA  
AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO EXÓCRINA  
DO TESTÍCULO DE RATO**

**Trabalho apresentado à Universidade  
Federal de Santa Catarina, para a  
obtenção do Grau de Médico no Curso de  
Graduação em Medicina.**

**FLORIANÓPOLIS**

**1998**

**EDUARDO ARNAUT DOS SANTOS LIMA**

**PARÂMETROS SEMINAIS PARA  
AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO EXÓCRINA  
DO TESTÍCULO DE RATO**

**Trabalho apresentado à Universidade  
Federal de Santa Catarina, para a obtenção  
do Grau de Médico no Curso de Graduação  
em Medicina.**

**Coordenador: Prof. Dr. Edson José Cardoso**

**Orientador: Prof. Dr. Armando José d'Acampora.**

**Co-orientador: Dr. Edevard José de Araújo.**

**FLORIANÓPOLIS**

**1998**

Santos Lima, Eduardo Arnaut dos. Parâmetros seminais para avaliação da função exócrina do testículo de rato. Florianópolis, 1998. 45p.

Trabalho apresentado à Universidade Federal de Santa Catarina, para a obtenção do Grau de Médico no Curso de Graduação em Medicina – Universidade Federal de Santa Catarina.

1. Epidídimo 2. Sêmen 3. Micromanipulação 4. Ratos

## **AGRADECIMENTOS**

Ao **Dr. EDEVARD JOSÉ ARAUJO**, meu co-orientador, minha especial gratidão, não só pelos valiosos ensinamentos dispensados no encaminhamento deste trabalho, mas principalmente pela gentileza e respeito a mim dispensados.

Ao meu orientador **Dr. ARMANDO JOSÉ d'ACAMPORA**, Chefe da Disciplina de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da Universidade Federal de Santa Catarina, por sua extrema dedicação ao Curso e aos alunos, pela criteriosa revisão e pelas correções de grande valia.

Aos colegas acadêmicos de medicina **ALEXANDRE LUIZ WEBER** e **ANDRÉ LUÍS BRAGAGNOLO BORDIN**, pela contribuição durante a realização dos experimentos.

Aos **Professores da Disciplina de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da UFSC**, e um agradecimento especial ao funcionário **LUIZ HENRIQUE PRAZERES**.

À Professora **Dr.<sup>a</sup> SÍLVIA MODESTO NASSAR (INE/CTC/UFSC)**, pela análise estatística do trabalho.

Ao Serviço de Cirurgia Pediátrica do Hospital Infantil Joana de Gusmão.

A todos os colegas do Curso de Graduação em Medicina.

À **Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC**, e a direção do **Hospital Universitário**.

Ao **Biotério Central**, principalmente na figura do seu Diretor **JOANÉSIA MARIA JUNKES ROTSTEIN** e ao Serviço de Patologia Clínica do Hospital



**Universitário da UFSC, principalmente na figura do seu chefe, LUIZ ALBERTO PEREGRINO FERREIRA.**

**Ao Laboratório Médico Santa Luzia S.A., principalmente na figura do seu Diretor-Presidente Dr. JOÃO NILSON ZUNINO e da Bioquímica DENISE MICHELS.**

**À ELIANI GREGÓRIO DA SILVA, minha namorada e companheira, pela paciência e carinho.**

**A todos os amigos e familiares.**

## ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVO .....	4
3. MÉTODO .....	5
4. RESULTADOS.....	15
5. DISCUSSÃO .....	18
6. CONCLUSÃO .....	23
7. REFERÊNCIAS.....	24
NORMAS ADOTADAS.....	30
RESUMO.....	31
SUMMARY .....	32
APÊNDICE 1.....	33
ANEXO 1 .....	34
ANEXO 2 .....	37

# 1. INTRODUÇÃO

Meticulosas medidas das funções de um órgão tem sido de vital importância, tanto para o aspecto clínico, quanto para os estudos experimentais<sup>1</sup>.

O testículo tem exercido duas importantes funções fisiológicas: endócrina e exócrina<sup>1,2,3</sup>. A primeira compreende a produção de hormônios esteróides sexuais pelas células de LEYDIG, no interstício testicular, responsável principalmente por: 1) diferenciação sexual normal do homem durante a embriogênese; 2) desenvolvimento e manutenção das características sexuais secundárias; 3) pela função sexual normal<sup>1,2</sup>.

A função exócrina, caracteriza-se pela espermatogênese, principal fator responsável pela reprodução, envolvendo: 1) diferenciação e maturação das células situadas nos compartimentos dos túbulos seminíferos; 2) armazenamento, maturação e transporte de espermatozóides<sup>1,2</sup>. Ambas as funções, endócrina e exócrina, são encontradas intimamente interligadas<sup>1,2,3</sup>.

No homem, para o estudo da fertilidade, utilizou-se a avaliação da função exócrina do testículo, por um método direto, avaliando-se os parâmetros seminais<sup>1,2,3,4</sup>.

Em animais, para o estudo da fertilidade, a função exócrina testicular foi avaliada por um método direto, através da análise dos parâmetros seminais, e por métodos indiretos, como: os estudos histológicos, peso testicular, o acasalamento, dosagem de anticorpos, dosagem de hormônios, a dosagem de DNA das células testiculares e estudos morfométricos<sup>1,5</sup>.

Alguns estudos experimentais associaram mais de um método, como: peso testicular, produção diária de esperma, estudo histológico, estudo

desenvolver então, uma variação técnica, em que o sêmen que exteriorizava-se, imediatamente após a secção transversal e completa dos ductos da cauda do epidídimo, fosse aspirado por meio de micropipetas de laboratório. Essa modificação da técnica tornou-a mais simples, prática e de fácil execução<sup>51</sup>.

Houve necessidade, no entanto, de verificar se tal método era confiável para avaliar os valores seminais do rato.

## **2. OBJETIVO**

Avaliar a técnica de microaspiração do esperma da cauda do epidídimo.

### 3. MÉTODO

#### AMOSTRA

Utilizou-se um único grupo de 35 ratos albinos machos, adultos, da linhagem **WISTAR** (*Rattus norvergicus albinus*, *Rodentia mamalia*), variedade UFSC, com peso médio de 366 gramas (g), fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e, após um período de 5 dias para adaptação no Laboratório de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental (TOCE) do Departamento de Clínica Cirúrgica da UFSC, foram submetidos ao experimento.

Durante toda a investigação os animais foram acondicionados em gaiolas de plástico de 16 X 40 X 60 centímetros (cm), receberam água e alimentação própria para a espécie, permanecendo acomodados à luz natural e em condições de ambiente adequadas.

#### PROCEDIMENTO ANESTÉSICO

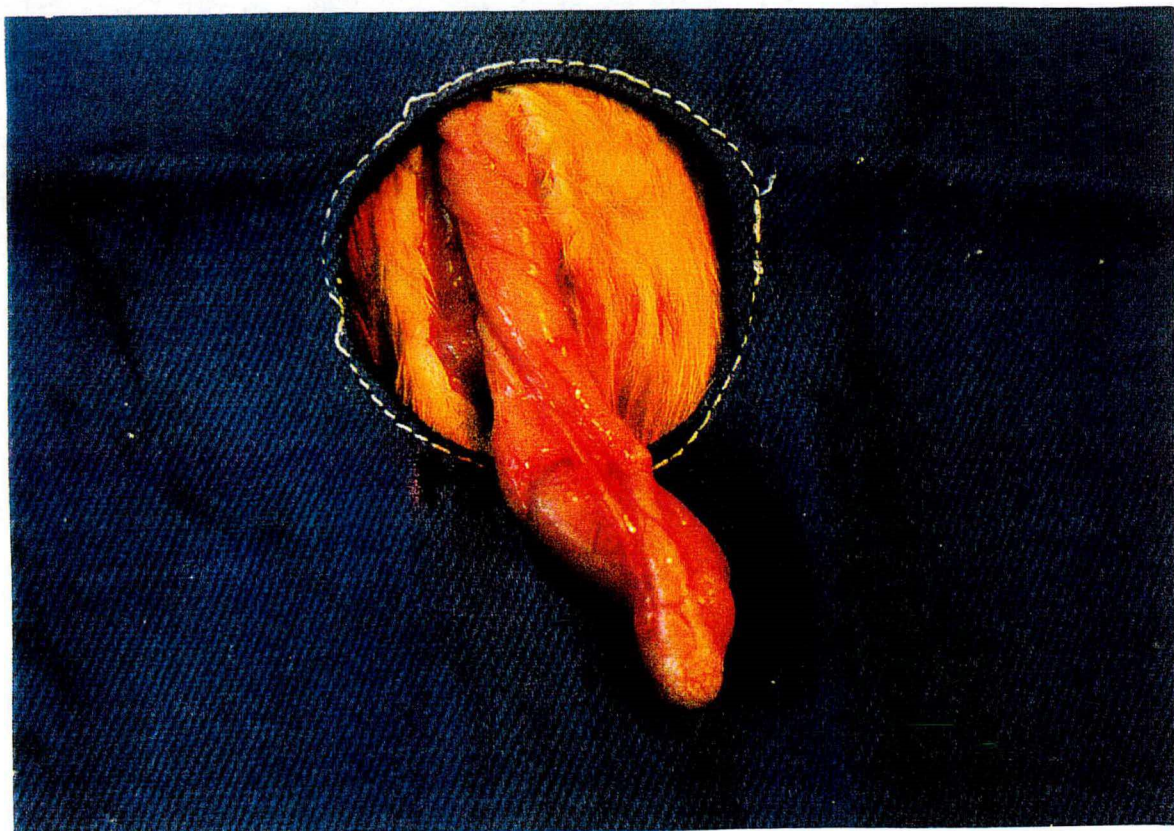
Os ratos receberam nas 12 horas que antecederam o experimento somente água. Após a pesagem os animais foram submetidos a uma injeção na cavidade peritoneal (*cavum peritonei*) de 0,4 ml para ratos com peso corporal de até 250 g e 0,6 ml para ratos com peso maior de que 250 g de uma solução de **ketamina** e

**xilasina**, na proporção de 5 : 1, respectivamente. A efetividade da anestesia foi avaliada pela ausência de movimentação, do reflexo córneo-palpebral (*cornea palpebrae*) e quando não houve reação motora após preensão, com pinça, do coxim adiposo de uma das patas traseiras (*membrum pelvinum*). Uma vez comprovado o plano anestésico, os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico.

## PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Os animais foram posicionados em decúbito dorsal em placas de madeira de 30 x 35 cm, e fixados com elástico nas patas dianteiras (*membrum thoracicum*) e traseiras. Foi realizado anti-sepsia da região pélvica (*regio abdominis caudalis*) com solução alcoólica de iodo a 2%. A via de acesso foi longitudinal, de aproximadamente dois centímetros, na metade esquerda do escroto (*scrotum*). Foi realizado abertura de todos os planos até a exposição do testículo (*testis*), seguido de secção do gubernáculo (*gubernaculum testis*) (**Figura 1**).

O epidídimo foi identificado para a realização do procedimento de micropipetagem do esperma com análise da motilidade e concentração de espermatozóides. Ambos testículos foram submetidos a procedimentos idênticos. O animal foi submetido à eutanásia por exsanguinação, pela secção da veia cava inferior (*vena cava caudalis*), imediatamente após este procedimento.

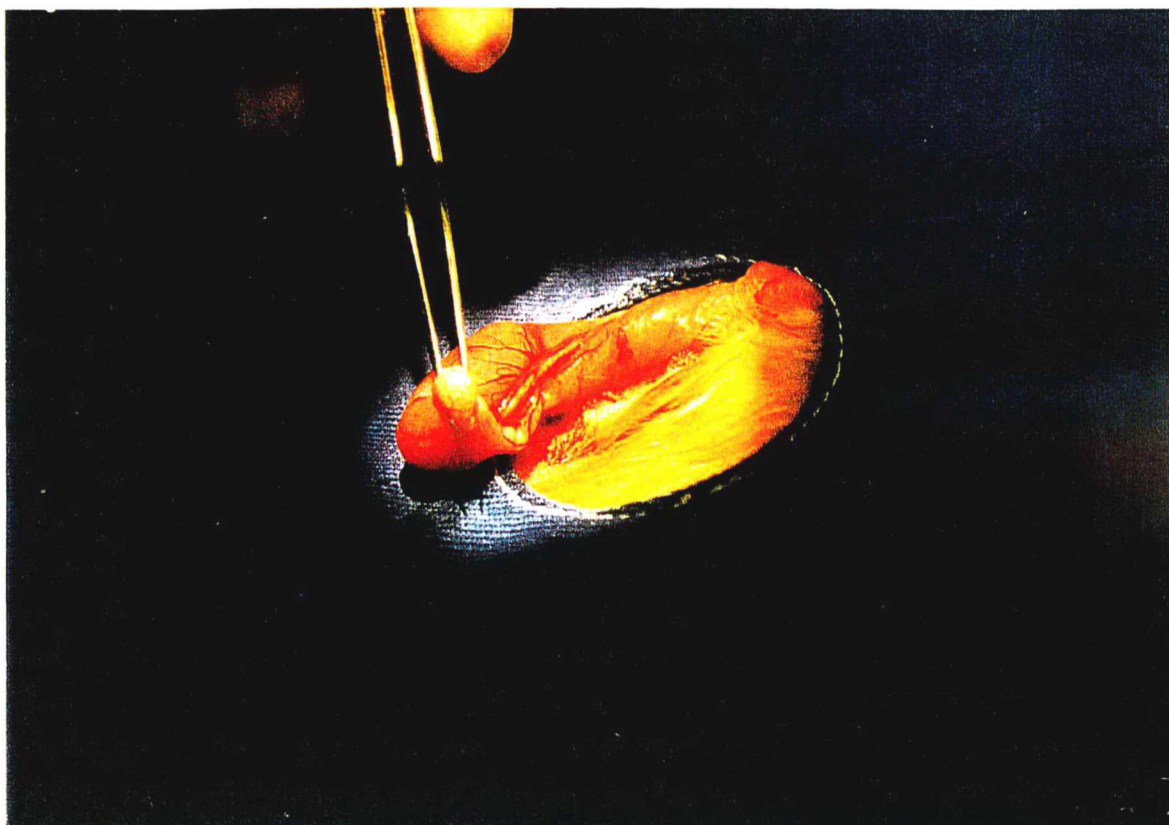


**FIGURA 1** – Exposição do testículo direito.

### **TÉCNICA DE MICROASPIRAÇÃO DO ESPERMA (*SPERMA*):**

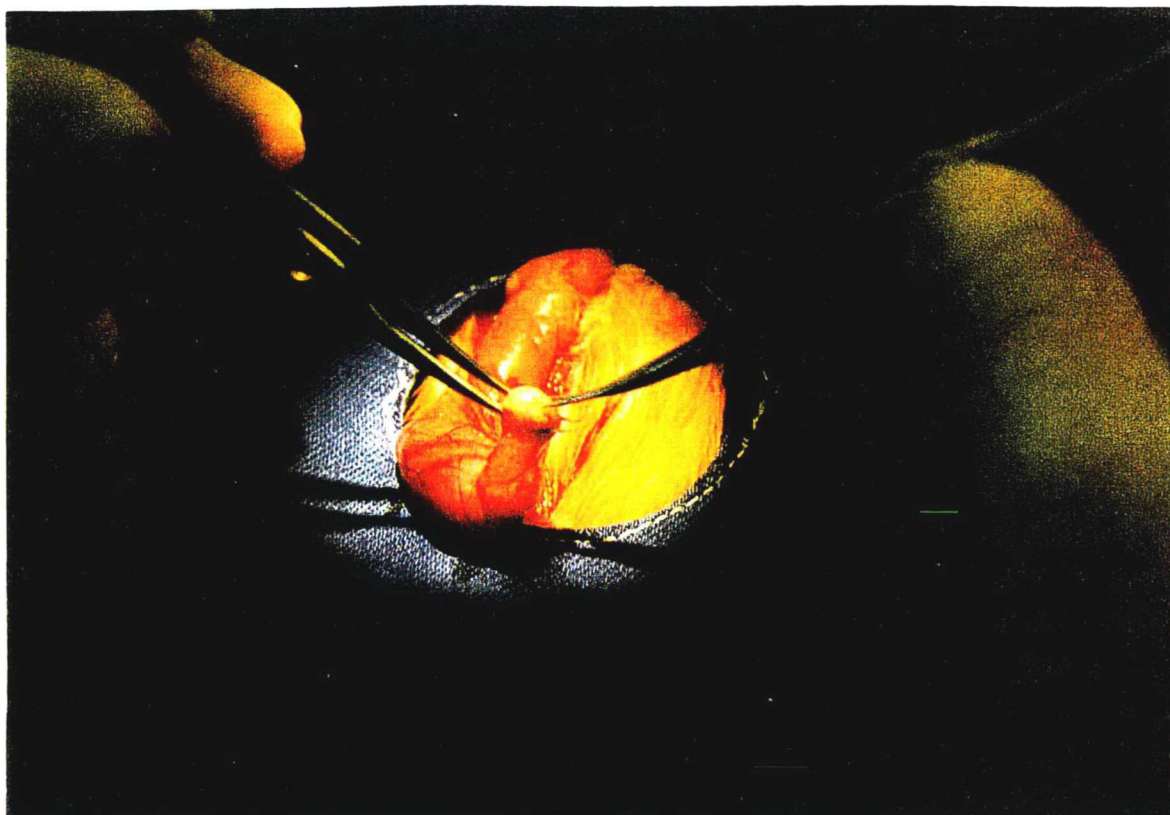
Após exposição e identificação da cauda do epidídimo (*cauda epididymis*), utilizando um microscópio cirúrgico **DF VASCONCELOS** com aumento de 16 vezes, foi realizado a preensão da região distal da cauda do epidídimo com pinça de microcirurgia tipo íris (**Figura 2**).



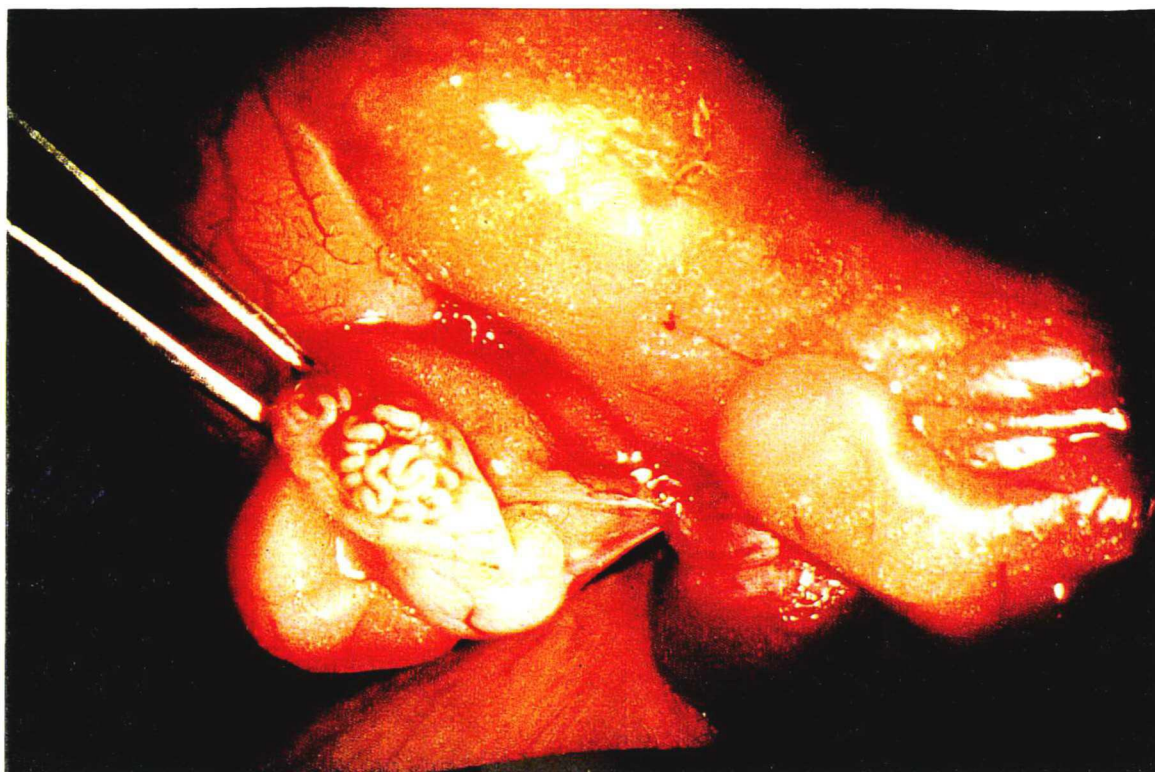


**FIGURA 2** – Preensão da região distal da cauda do epidídimo, com pinça de microcirurgia tipo íris.

Foi realizado uma incisão na túnica epididimária (*septum epididymidis*) (**Figura 3**), com exposição do ducto epididimário (*ductus epididymidis*) (**Figura 4**), seguida de uma secção transversal completa do mesmo, com saída do esperma (*sperma*).

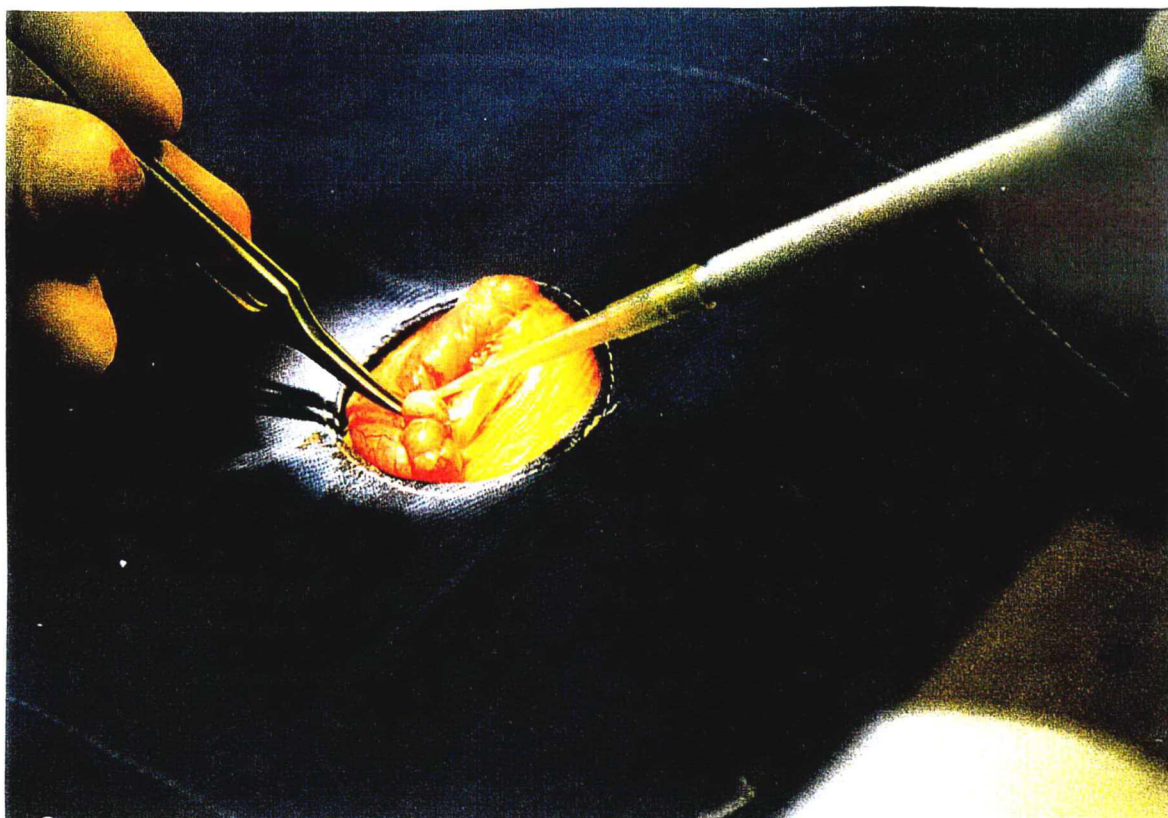


**FIGURA 3** – Incisão na túnica epididimária.



**FIGURA 4** – Exposição dos ductos epididimários.

Foi utilizada uma micropipeta com capacidade de 5 microlitros ( $\mu\text{L}$ ) para a aspiração do esperma (**Figura 5**). O material aspirado foi colocado em tubo de **EPENDORF** contendo 200  $\mu\text{L}$  de cloreto de sódio a 0,9 %, mantido a uma temperatura de 37 °C.



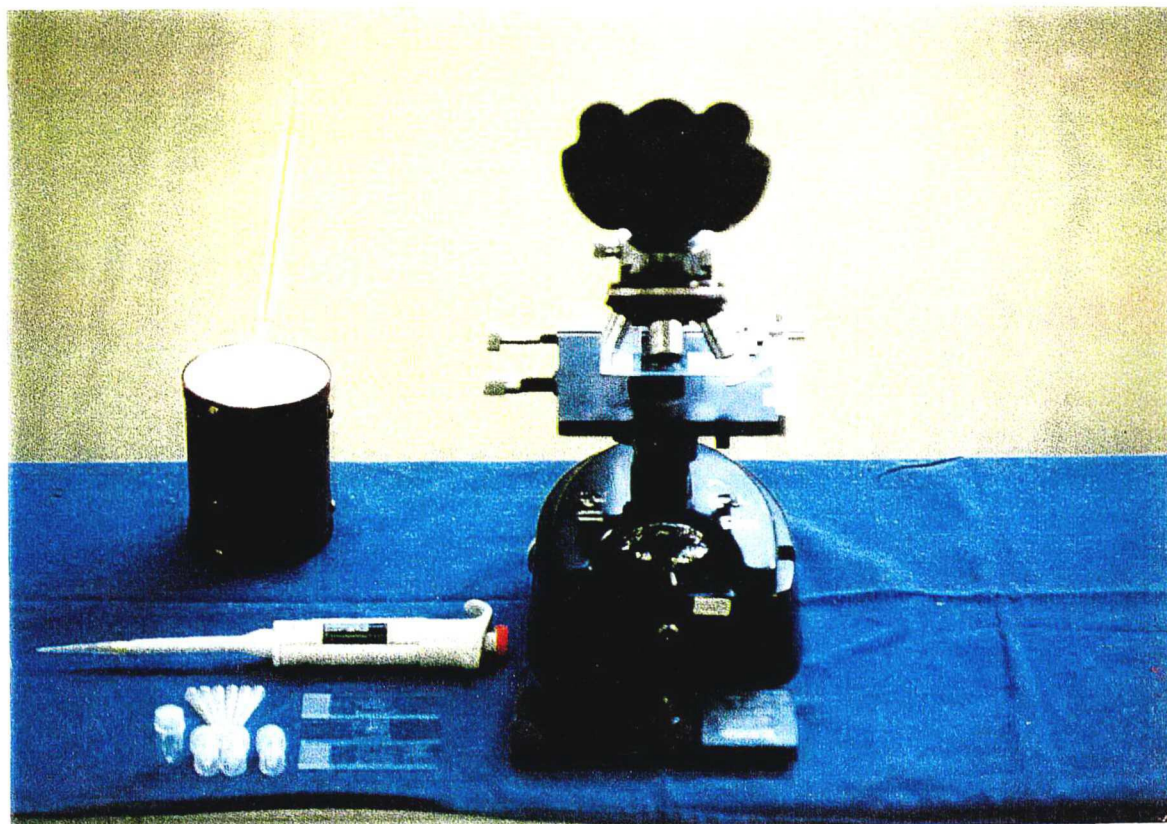
**FIGURA 5** – Aspiração do esperma da região distal da cauda do epidídimo, com micropipeta de 5  $\mu\text{L}$ .

## **AVALIAÇÃO DA MOTILIDADE E CONCENTRAÇÃO ESPERMÁTICA**

Foi coletado 5 microlitros da solução contendo cloreto de sódio 0,9 % e esperma, os 5 microlitros foram colocados em uma lâmina de vidro e em seguida foi sobreposta uma lamínula de 20 X 20 milímetros, onde foi estendida a amostra.



Foi utilizado um microscópio de luz para uso clínico, foi posicionada a objetiva num aumento de 200 vezes, foi abaixado o condensador até que não houvesse dispersão da luz (**Figura 6**).

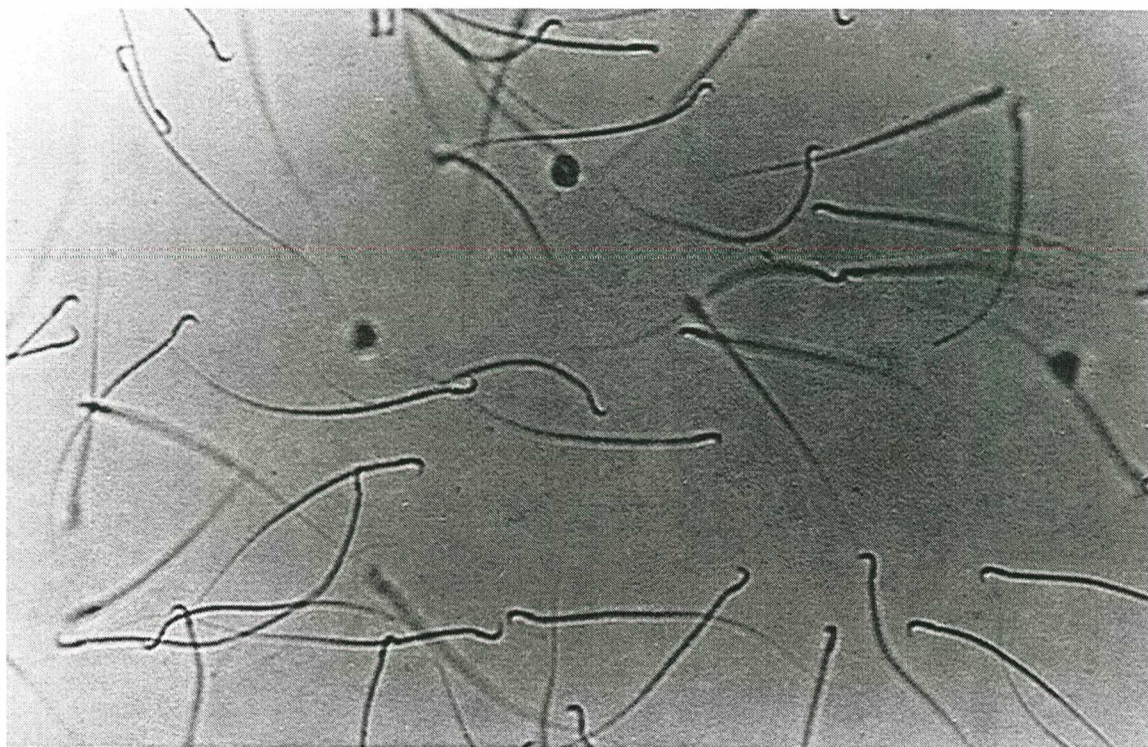


**FIGURA 6** – Esperma entre lâmina e lamínula, utilização de microscópio de luz e posicionamento da objetiva com aumento de 200 vezes.

Foram rastreados campos em número de 2, para que acumulassem uma centena de espermatozóides (*espermatozoon*) sucessivos. Os espermatozóides foram classificados em móveis e imóveis, com o auxílio de um contador de laboratório (**Figura 7**).

O número de espermatozóides móveis contados correspondeu ao percentual de motilidade.





**FIGURA 7** – Observação dos espermatozóides do rato em um aumento de 200 vezes, para contagem da motilidade.

Após a medida da motilidade espermática foi medida a concentração de espermatozóides, colocando-se 10 microlitros de ovoalbumina bovina no tubo de **EPENDORF** contendo a solução de cloreto de sódio 0,9 % e esperma, eliminando os grumos de espermatozóides. Em seguida, o tubo, após ter permanecido em um agitador de laboratório durante 3 minutos, onde houve a homogeneização da amostra, foi deixado em repouso, no balcão, durante 2 minutos, para a sedimentação do material.

O material em seguida foi colhido, através de uma micropipeta com capacidade de 5 microlitros, colocado na câmara de **MAKLER (Counting chamber MAKLER, SEFI - Medical Instruments)**, após foi sobreposto por uma lamínula e foi observado com um microscópio de luz (**Figura 8**).

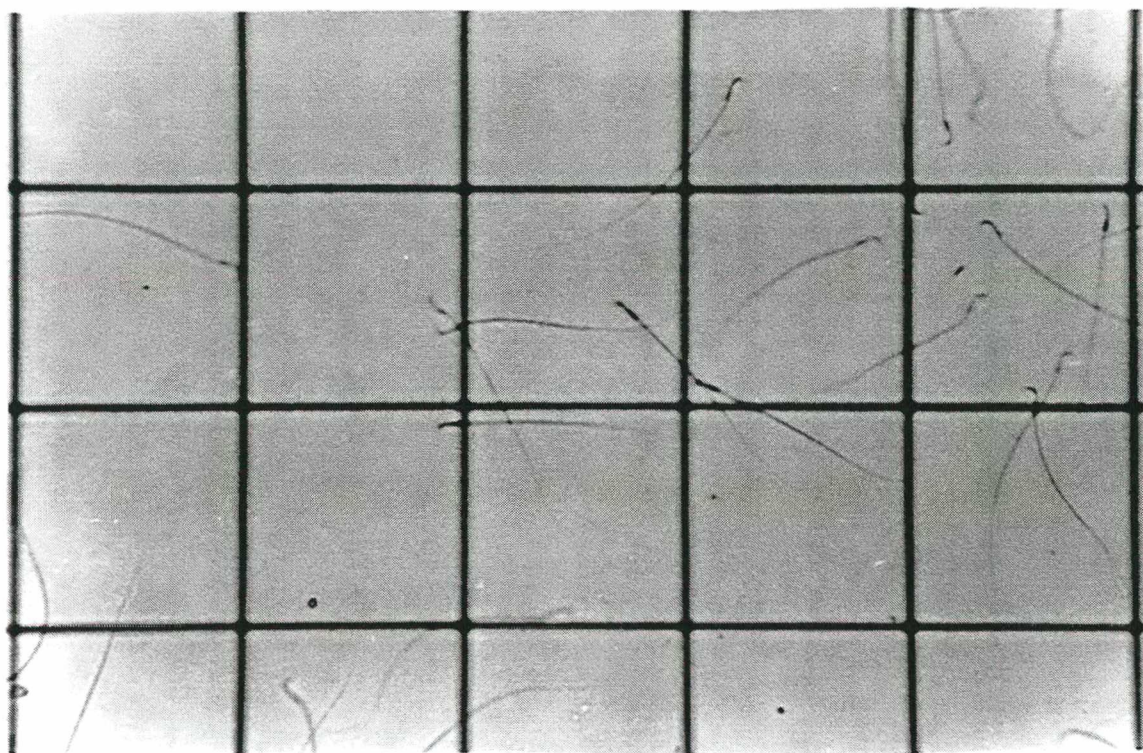




**FIGURA 8** – Material colhido, colocado na Câmara de **MAKLER** (Counting chamber MAKLER, SEFI - Medical Instruments) e sobreposição da lamínula.

A câmara de **MAKLER** continha 100 divisões, em quadriláteros. Foram feitas 3 contagens. A primeira, foi feita em 10 quadrados, e o resultado foi multiplicado por 1.000.000. A segunda, foi feita em 50 quadrados, e o resultado foi multiplicado por 500.000. A terceira, foi feita nos 100 quadrados e o resultado foi multiplicado por 100.000 (**Figura 9**). Os 3 resultados foram somados e divididos por 3, onde foi obtido uma média simples. O valor da média simples foi multiplicado por 20, como fator de correção para a diluição feita na micropipetagem do ducto epididimário. O valor obtido correspondeu à concentração de espermatozóides do rato em 1 mililitro.



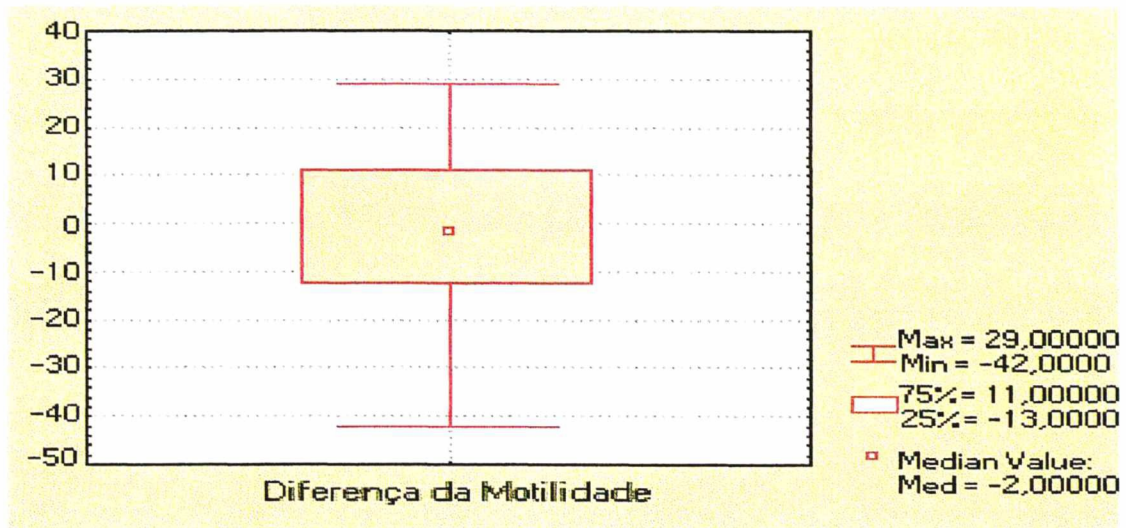


**FIGURA 9** – Visão dos espermatozóides nos quadriláteros da câmara de **MAKLER**, para avaliar a concentração. Aumento de 400 vezes.

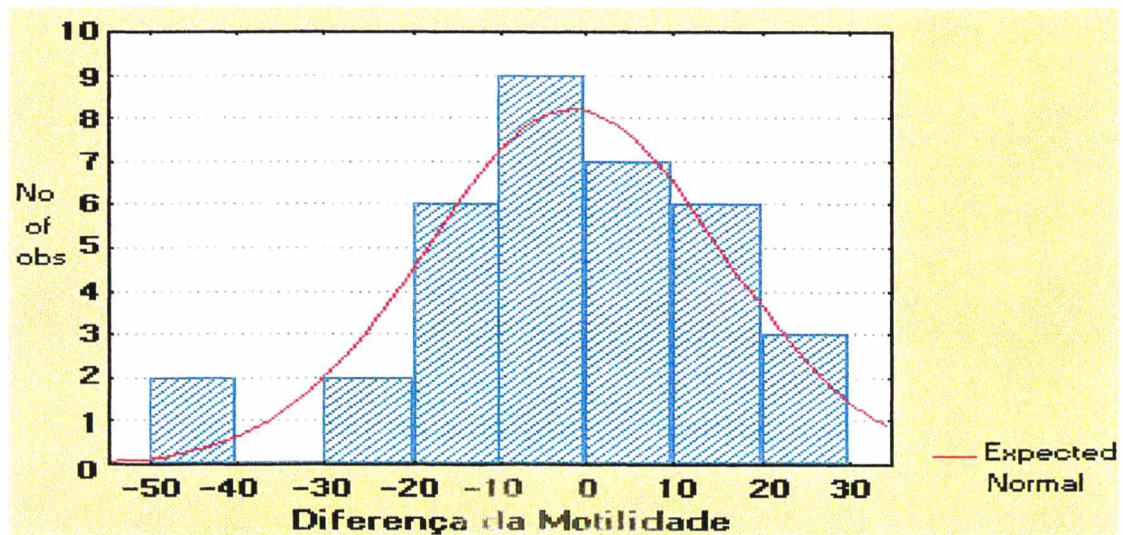
Os ratos foram registrados em uma ficha, onde continha o seu número, dados individuais, procedimentos realizados e os dados coletados (**apêndice 1**).

Para análise dos resultados utilizou-se o programa de computador **STATGRAPHICS** versão 5.0 e o **STATISTICA** versão 6.0, aplicando-se o teste t de **STUDENT** para amostras dependentes com  $\alpha = 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

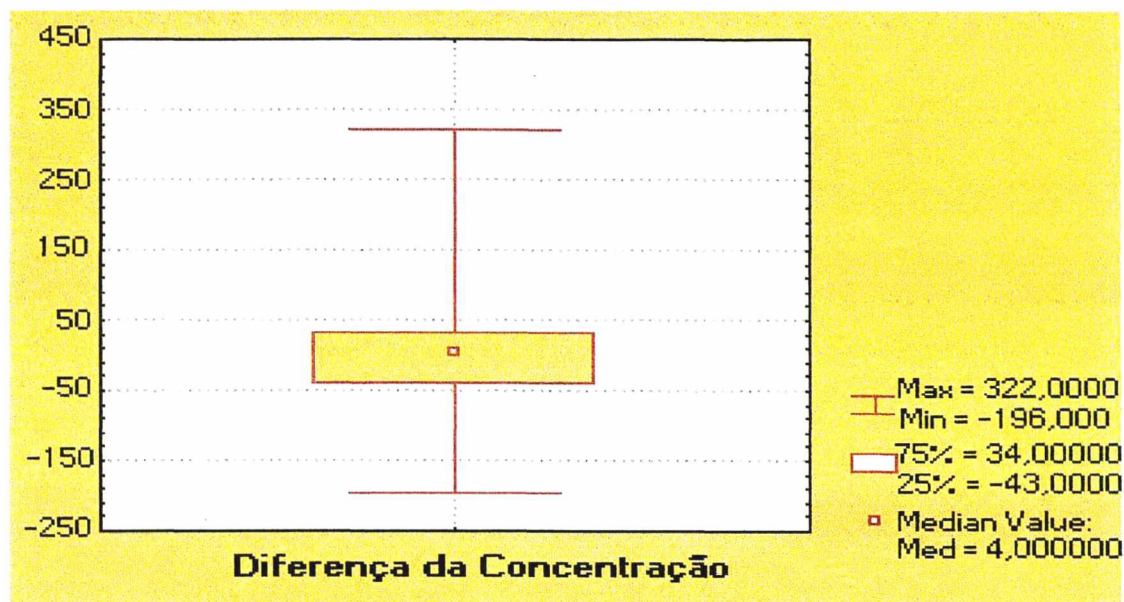


**FIGURA 10** – Parâmetros seminais para a avaliação da função exócrina testicular de ratos. Figura representando as diferenças da motilidade espermática do testículo direito e esquerdo.

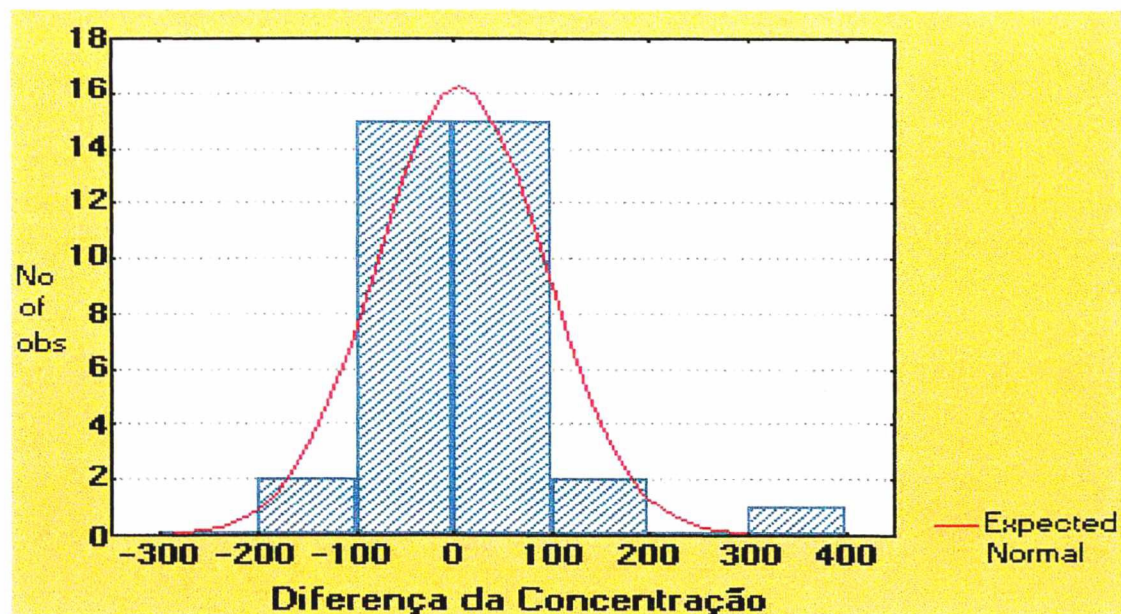


**FIGURA 11** – Parâmetros seminais para a avaliação da função exócrina testicular de ratos. Curva de distribuição esperada dos resultados da motilidade espermática, para o teste t de SDUDENT e a representação gráfica dos resultados obtidos.





**FIGURA 12** – Parâmetros seminais para a avaliação da função exócrina testicular de ratos. Figura representando as diferenças da concentração espermática do testículo direito e esquerdo.



**FIGURA 13** – Parâmetros seminais para a avaliação da função exócrina testicular de ratos. Curva de distribuição esperada nos resultados da concentração espermática, para o teste t de SDUDENT e a representação gráfica dos resultados obtidos.

**QUADRO 1** – Parâmetros seminais para a avaliação da função exócrina testicular de ratos. Médias das concentrações e das motilidades espermáticas dos testículos direito e esquerdo.

	Motilidade [%]	Concentração (Espermatozóides)
Testículo Direito	60,57 [13,24]*	10.551.428 (7.952.680)*
Testículo Esquerdo	62,17 [11,62]*	9.920.000 (5.661.580)*

\*Desvio Padrão.

A motilidade dos espermatozóides da amostra foi em média de 60,57% no testículo direito e 62,17% no esquerdo, com desvio padrão de 13,24 e 11,62, respectivamente (**Quadro 1**). A **Figura 10** representa a análise estatística da motilidade espermática da amostra. A representação gráfica dos resultados obtidos da motilidade espermática e a curva de normalidade aceitável do teste estatístico utilizado foram expressos na **Figura 11**.

A concentração espermática da amostra foi em média de 10.551.428 espermatozóides/ $\mu$ L no testículo direito e 9.920.000 espermatozóides/ $\mu$ L no testículo esquerdo, com desvio padrão de 7.952.680 e 5.661.580, respectivamente (**Quadro 1**). Na **Figura 12** foi expressa a análise estatística da concentração espermática da amostra. A representação gráfica dos resultados obtidos da motilidade espermática e a curva de normalidade aceitável do teste estatístico utilizado foram colocados no **Figura 13**.

## 5. DISCUSSÃO

Os trabalhos experimentais sobre a avaliação da função exócrina testicular apresentam resultados controversos<sup>1</sup>. Torna-se difícil analisá-los, principalmente pela falta de homogeneidade nos modelos experimentais, como: o tipo e a espécie do animal utilizado, sua idade no momento da experimentação, forma de avaliação e obtenção do material<sup>1</sup>.

O rato foi escolhido como animal de experimentação pela facilidade no manuseio, obtenção, manutenção em cativeiros, e utilização quase unânime entre os modelos experimentais<sup>51</sup>.

Devido à disponibilidade de fornecimento pelo **Biotério Central da UFSC**, baseado também em trabalhos que utilizaram ratos da linhagem **WISTAR**, no estudo da função exócrina testicular<sup>1,3,5,17,19,24,31,32,33,39,40</sup>, essa linhagem foi utilizada neste experimento.

Quanto à idade do animal, a função testicular exócrina seria melhor aferida, se realizada no período sexualmente maduro.

Um estudo fundamental realizado por **ROBB, AMANN E KILLIAN**<sup>17</sup> avaliou o testículo e o epidídimo de ratos da linhagem **WISTAR** e observou que os mesmos só podem ser estudados em fase sexualmente madura após os 100 dias de vida. Esses achados fizeram com que, no presente estudo, fosse escolhida a idade maior que 150 dias.

No entanto, **HARRISON e OETTLÉ**<sup>52</sup> citaram que uma espermatogênese normal em ratos **WISTAR** albinos só poderia ser esperada após alcançarem 130 gramas de peso.

Dentre os diversos métodos de avaliação da função exócrina testicular, os mais usados foram os estudos histológicos por microscopia óptica ou eletrônica<sup>1,7,8,9,10,11,12,13,14,16,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44</sup>. Todavia, não foram específicos para prever a capacidade fértil, em virtude da heterogeneidade do tecido testicular e também deixaram dúvida se as lesões celulares podiam prever com segurança a qualidade da produção espermática e a capacidade fértil do animal. As avaliações histológicas traduziram, no máximo, um aspecto da maturação espermática e não uma medida na produção de esperma<sup>1,9,14,35</sup>.

Alguns autores<sup>11,14</sup> verificaram uma discrepância entre um tipo muito comum de avaliação histológica – a média do diâmetro dos túbulos seminíferos – e a fertilidade<sup>14</sup>.

Outros testes como: dosagem de hormônios<sup>5,7</sup> e medida de produção diária de esperma<sup>7</sup>; dosagem de DNA das células testiculares com índice de espermatogênese<sup>5</sup>, exigem técnicas ou aparelhos sofisticados, elevando o custo e maior tempo do experimento<sup>51</sup>.

Já foi estabelecido que os parâmetros seminais não traduzem completamente a capacidade reprodutora do animal, uma vez que esta depende principalmente da capacidade fértil do espermatozóide, avaliada de outras formas<sup>1,2,4,5</sup>. Entretanto, futuramente, possíveis correlações poderiam ser realizadas, tendo os estudos experimentais um método de avaliação mais simples e prático. Isso poderia proporcionar agilização nas pesquisas sobre fertilidade no homem<sup>1</sup>.

A obtenção do sêmen através da eletroejaculação deixou a desejar pela falha na obtenção do mesmo, apesar da estimulação repetida, e também pelo o volume inconstante obtido. Além disso, não permitiu nenhuma informação a respeito da função exócrina de um testículo individualmente<sup>1</sup>.

Os testes de fertilidade através da contagem de espermatozóides impregnados no intróito vaginal, apenas detectou a presença do espermato, sem nenhuma análise qualitativa<sup>14,51</sup>.

O acasalamento, por sua vez, permitiu avaliar a função final do testículo exócrino<sup>15</sup>. Porém, não permitiu o estudo individual de cada testículo e não permitiu um paralelo ao que se realiza na clínica<sup>53</sup>. Além disso, do ponto de vista bioético foi questionado, pois o número de animais sacrificados tem sido extremamente alto, o que aumenta os custos e contesta a tendência que preza pelo uso racional dos animais de experimentação<sup>54</sup>.

A obtenção do sêmen de rato, através da coleta do lavado do deferente<sup>14,46</sup>, seria a melhor forma de avaliar a função exócrina de cada testículo, medindo a quantidade e qualidade do espermatozóides produzidos. Entretanto, não tem sido um método prático ou de fácil reprodução<sup>46</sup>.

Na técnica de micropunção dos túbulos seminíferos foram utilizadas micropipetas cujas pontas tinham 10-40 micra de diâmetro que, com auxílio de microscópio, eram introduzidas na luz dos túbulos para colher amostras de até 200 nanolitros, com objetivo de analisar a composição dos fluidos dos túbulos seminíferos<sup>46</sup>.

**HOWARDS e JOHNSON<sup>55</sup>**, também adaptaram estas técnicas de micropunção para avaliar aspectos reprodutivos dos ratos. Foram colhidas amostras de até 300 nanolitros da cabeça e cauda do epidídimo e centrifugadas para obter o que denominaram espermatócrito. Ao mesmo tempo examinaram 100 células para estudar a morfologia das mesmas. Concluíram que o espermatócrito da cauda do epidídimo era superior ao dos túbulos seminíferos e que isso refletia a sua função de armazenamento. Propuseram a utilização desta técnica para estudo dos túbulos seminíferos e do epidídimo, pois facilitaria e aceleraria as pesquisas no campo da fisiologia da reprodução masculina.

**TURNER e HOWARDS**<sup>49</sup> utilizaram também a técnica de micropunção *in vivo* da cauda do epidídimo. Através de micropipetas especialmente fabricadas, com capacidade para 500 nanolitros ou 1 microlitro, avaliaram a motilidade do espermatozóides. Foi observado que o início da motilidade dependia da adição de soluções iônicas situadas entre a hiper e a hiposmolaridade.

Posteriormente **TURNER**<sup>52</sup> atribuiu ao epidídimo, além da função de armazenamento, também as de transporte, concentração e maturação de espermatozóides. Verificou também que a concentração de espermatozóides aumenta da cabeça para a cauda, devido à remoção do fluido por toda a extensão dos túbulos. Na cauda do epidídimo mantém-se um ambiente constante para as células espermáticas que finalizam a sua maturação. Manifestou que os pesquisadores para estudarem a fisiologia do epidídimo faziam conclusões a respeito das células ali existentes, obtendo-as através de técnicas de homogeneização. O homogeneizado obtido continha elementos epiteliais, vasculares e intersticial, contaminando assim a amostra. Desse modo considerava a micropunção do túbulo, na cauda do epidídimo, uma técnica que podia evitar esse indesejável aspecto. Ratificou que os espermatozóides obtidos através da micropunção são imóveis, mas que, quando diluídos com qualquer variedade de solução iônica cujo pH e osmolaridade se aproximam das condições fisiológicas, uma vigorosa motilidade sobrevêm.

Foi definido que a avaliação do sêmen, como produto final da função exócrina do testículo, seria um método até certo ponto mais lógico que os demais, de igual valor científico e bem mais próximo da clínica. Para evitar a aquisição das micropipetas especiais para introduzir nos ductos seminíferos, o estudo foi continuado, sendo observado que após a exposição dos ductos da cauda do epidídimo e sua secção de forma completa e transversal, observou-se a imediata



exteriorização do sêmen do rato. Com o auxílio de um microscópio cirúrgico e de uma micropipeta de laboratório de análises, o material foi aspirado e analisado. Ao invés de uma micropunção, foi realizada uma microaspiração. A obtenção do sêmen com manobras suaves, a sua colocação em 200 microlitros de uma solução salina mantida a 37 °C, e sua análise entre lâmina e lamínula dentro de um curto tempo, tornou possível avaliar a motilidade desses espermatozóides. Analisando-se 100 células e separando-as em móveis e imóveis, se obteve o percentual de motilidade dos espermatozóides. Posteriormente, o material foi colocado na câmara de **MAKLER**, e foi realizada uma contagem como a de um espermograma. Foi obtida a concentração dos espermatozóides do rato, bastando apenas corrigir os fatores de diluição da coleta.

A amostra comportou-se uniformemente, ficando os resultados tanto da motilidade quanto da concentração espermática, dentro da curva de distribuição esperada para o teste t de STUDENT. A mediana da diferença dos resultados do testículo direito e esquerdo, tanto para a motilidade quanto para a concentração, manteve-se próxima de zero, mostrando ter havido pequenas diferenças entre os resultados. Com a análise estatística da motilidade e concentração espermática, obteve-se um  $t = 0,555$ ,  $p = 0,581$  e  $t = 0,434$ ,  $p=0,666$ , respectivamente, mostrando que as diferenças dos resultados não foram estatisticamente significantes.

Os resultados demonstraram que o esperma do rato da cauda do epidídimo, obtido através do aspirado, pôde ser avaliado através de valores seminais tipo motilidade e concentração espermática, de forma confiável.

Resta agora vencer mais uma etapa dentro desta mesma linha: verificar se os parâmetros seminais podem ser correlacionados com outras formas de avaliação do testículo exócrino, como o teste do acasalamento, por exemplo.

## **6. CONCLUSÃO**

A técnica de microaspiração da cauda do epidídimo permite a obtenção do esperma do rato de forma prática e confiável.



## 7. REFERÊNCIAS

1. Ryan PC, Whelan CA, Fitzpatrick JM. The vas deferens count: a new accurate method for experimental measurement of testicular exocrine function. *Eur Urol* 1988; 14: 156-9.
2. Matsumoto AM. O testículo e a função sexual masculina. In: Wyngaarden JB, Smith LH, Bennett JC. *Cecil Tratado de Medicina Interna*. 19ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1993. p.1360-65.
3. Junqueira LC, Carneiro J. Aparelho reprodutor masculino. In: Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica*. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1974. p.402-17.
4. Passos EP, Freitas F, Facin AC, Filho JSLC. Infertilidade e técnicas de reprodução assistida. In: Freitas F, Menke CH, Rivoire W, Passos EP. *Rotinas em Ginecologia*. 3ª ed. Porto Alegre: Artes Médicas; 1997. p.317-26.
5. Janetschek G, Heilbronner R, Schachtner W, Rohr HP, Mikuz G, Bartsch G. Unilateral testicular disease: effect on the contralateral testis (morphometric study). *J Urol* 1987; 138: 878-82.
6. Turner TT, Brown KJ. Spermatoc cord torsion: loss of spermatogenesis despite return of blood flow. *Biol Reprod* 1993; 49: 401-7.
7. Becker EJJr, Turner TT. Endocrine and exocrine effects of testicular torsion in the prepuberal and adult rat. *J Androl* 1995; 16(4): 342-51.
8. Jhunjhunwala JS, Desai A, Kropp KA. Torsion of the spermatic cord. An experimental study. *Inv Urol* 1976; 13: 318-20.

9. Turner TT. Acute experimental testicular torsion. No effect on the contralateral testis. *J Androl* 1985; 6: 65-72.
10. Turner TT. On unilateral testicular and epididymal torsion: no effect on the contralateral testis. *J Urol* 1987; 138: 1285-90.
11. Heindel RM, Pakyz RE, Reinking LN, Cosentino MJ. The effect of various degrees of unilateral spermatic cord torsion on fertility in the rat. *J Urol* 1990; 144: 366-9.
12. Pakyz RE, Heindel RM, Kallish M, Cosentino MJ. Spermatic cord torsion: effects of cyclosporine and prednisone on fertility and the contralateral testis in the rat. *J Androl* 1990; 11(5): 401-8.
13. Madgar I, Lunenfeld B, Mashiach S, Goldwasser B, Weissenberg R. Effect of testicular torsion on contralateral testis and fertility in mature rats. *Arch Androl* 1987; 19: 237-41.
14. Kamada K, Takihara H, Shirataki S, Ishizu K, Baba Y. Flow cytometric DNA analysis demonstrates contralateral testicular deterioration in experimental unilateral testicular torsion of prepubertal rats. *Androl* 1993; 25: 239-44.
15. Merimsky E, Rock M, Katz S. Assessment of fertility after testicular torsion: an experimental study. *Urol Res* 1982; 10: 51-4.
16. Jhunjhunwala JS, Hikim APS, Budd CAC, Chakraborty J. Germ cell degeneration in the contralateral testis of the guinea pig with unilateral torsion of the spermatic cord. *J Androl* 1986; 7: 16-22.
17. Robb GW, Amann RP, Killian GJ. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. *J Reprod Fert* 1978; 54: 103-7.
18. Baker LA, Turner TT. Leydig cell function after experimental testicular torsion despite loss of spermatogenesis. *J Androl* 1995; 16: 12-7.
19. Ryan PC, Gorey TF, Fitzpatrick JM. Experimental testicular torsion: fixation without parenchymal trauma. *Eur Urol* 1988; 14: 141-4.

20. Cerasaro TS, Nachtsheim DA, Otero F, Parsons CL. The effect of testicular torsion on contralateral testis and the production of antisperm antibodies in rabbits. *J Urol* 1984; 132: 577-9.
21. Lewis-Jones DI, Lynch RV, Kerrigan DD, Davies I. Long-term study of the immuno-pathological consequences of sympathetic orchioepathia in the rat. *J Reprod Fertil* 1987; 80: 641-7.
22. Merimsky E, Orni-Wasserlauf R, YUST I. Assessment of immunological mechanism in infertility of the rat after experimental testicular torsion. *Urol Res* 1984; 12: 179-82.
23. Thomas WEG, Crane GA, Cooper MJ, Lee G. Testicular exocrine malfunction after torsion. *Lancet* 1984; 15: 1357-9.
24. Kearney SE, Lewis-Jones DI. Effect of ACTH on contralateral testicular damage and cytotoxic antisperm antibodies after unilateral testicular ischaemia in the rat. *J Reprod Fert* 1985; 75: 531-5.
25. Nagler HM, Deitch AD, White R. Testicular torsion: temporal considerations. *Fertil Steril* 1984; 42: 257-62.
26. Cosentino MJ, Rabinowitz R, Valvo JR, Ckett ATK. The effect of prepubertal spermatic cord torsion on subsequent fertility in rats. *J Androl* 1984; 5: 93-8.
27. Cosentino MJ, Nishida M, Rabinowitz R, Cockett ATK. Histological changes occurring in the contralateral testes of prepubertal rats subjected to various durations of unilateral spermatic cord torsion. *J Urol* 1985; 133: 906-11.
28. Karagüzel G, Gedikoglu G, Tanyel FC, Büyükpamakçı N, Hiçsönmez A. Subsequent biological effects of chemical sympathectomy in rats undergoing unilateral testicular torsion. *Eur Urol* 1995; 28: 147-51.

29. Chakraborty J, Jhunjhunwala J, Nelson L, Yong M. Effects of unilateral torsion of the spermatic cord on the contralateral testis in human and the pig. *Arch Androl* 1980; 4: 95-108.
30. Chakraborty J, Jhunjhunwala J. Experimental unilateral torsion of the spermatic cord in guinea pigs. *J Androl* 1982; 3: 117-23.
31. Wallace DMA, Gunter PA, Landon GV, Pugh RCB, Hendry WF. Sympathetic orchio-pathia - an experimental and clinical study. *Br J Urol* 1982; 54: 765-8.
32. Janetschek G, Schreckenberg F, Grimm W, Marberger M. Hemodynamics effects of experimental testicular torsion. *Urol Res* 1987; 15: 303-6.
33. Janetschek G, Schreckenberg F, Mikuz G, Marberger M. Experimental testicular torsion: effect on endocrine and exocrine function and contralateral testicular histology. *Urol Res* 1988; 16: 43-7.
34. Barkley C, York JP, Badalament RA, Nesbitt JA, Smith JJ, Drago JR. Testicular torsion and its effects on contralateral testicle. *Inv Urol* 1993; 41: 192-4.
35. Choi H, Choo MS, Kim KM, Kim WH, Lee YS, Chung M. The alterations of cellular metabolism in the contralateral testis following spermatic cord torsion in rats. *J Urol* 1993; 150: 577-80.
36. Henderson IV JA, Smey P, Cohen MS, Davis CP, Payer AF, Parkening F, et al. The effect of unilateral testicular torsion on the contralateral testicle in prepubertal chinese hamsters. *J Ped Surg* 1985; 20(6): 592-7.
37. Karagüzel G, Tanyel FC, Kiliñcu K, Büyüepamukçu N, Hiçsönmez A. The preventive role of chemical sympathectomy on contralateral testicular hypoxic parameters encountered during unilateral testicular torsion. *Br J Urol* 1994; 74: 507-10.

38. Kaya M, Harrison RG. An analysis of the effect of ischaemia on testicular ultrastructure. *J Path* 1974; 117: 105-17.
39. Lewis-Jones DI, Marval MM, Harrison RG. Impairment of rat spermatogenesis following unilateral experimental ischemia. *Fert Steril* 1982; 38: 482-90.
40. Madarikan BA. Testicular salvage following spermatic cord torsion. *J Ped Surg* 1987; 22: 231-4.
41. Nagler HM, White R. The effect of testicular torsion on the contralateral testis. *J Urol* 1982; 128: 1343-8.
42. Ortolano V, Nasrallah PF. Spermatic vessel ligation (Fowler-Stephens maneuver): experimental results with regard to fertility. *J Urol* 1986; 136: 211-3.
43. Sade M, Amato S, Buyuksu C, Mertan S, Canda MS, Kaplanoglu N. The effect of testicular torsion on the contralateral testis and the value of various types of treatment. *Brit J Urol* 1988; 62: 69-71.
44. Steinberger E, Tjioe DY. Spermatogenesis in rat testes after experimental ischemia. *Fertil Steril* 1969; 20: 639-49.
45. Birnbaum D, Hall T. An electroejaculation technique for rats. *Anat Rec* 1961; 140: 49-50.
46. Tuck RR, Setchell BP, Waites GMH, Young JA. The composition of fluid collected by micropuncture and catheterization from the seminiferous tubules and rete testis of rats. *Pflüg Arch* 1970; 318: 225-43.
47. Howards SSMD, Johnson AMS, Jessee SBS. Micropuncture and microalytic studies of the rat testis and epididymis. *Fertil Steril* 1975; 26(1): 13-9.
48. Scott JV, Dziuk PJ. Evaluation of the electroejacuation technique and the spermatozoa thus obtained from rats, mice and guinea pigs. *Anat Rec* 1959; 133: 655.

49. Turner TT, Howards SS. Factors involved in the initiation of sperm motility. Biol Reprod 1978; 18: 571-8.
50. Turner TT. On the epididymis and its function. Invest Urol 1979; 16: 311-9.
51. Araujo EJ. Efeitos da torção do cordão espermático sobre os parâmetros seminais do testículo contralateral em ratos pré-puberais [Tese Doutorado]. São Paulo: Escola Paulista de Medicina, 1998. 56p.
52. Harrison RG, Oetlé AG. Pathologic changes in the rat testis following ischaemia. Proc Soc Study Fertil 1950; 2: 6-11.
53. Ryan PC, Whelan CA, Gaffney EF, Fitzpatrick M. The effect of unilateral experimental testicular torsion on spermatogenesis and fertility. B J Urol 1988; 62: 359-66.
54. Barbeta PA. Estatística aplicada às ciências sociais 2ª ed. Florianópolis: Editora da UFSC; 1998.
55. Howards SS, Johnson A, Jessee S. Micropuncture and microanalytic studies of the rat testis and epididymis. Fert Steril 1975; 26: 13-9.

## **NORMAS ADOTADAS**

1. Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – Os princípios éticos da experimentação.
2. DeCS – Descritores em Ciência da Saúde. São Paulo, Bireme, 1992. 1111p.
3. International committee on veterinary gross anatomical nomenclature – Nomina anatomica veterinaria. 3 ed. New York, Ithaca, 1983. 216p.
4. Organización mundial de la salud – Manual de laboratorio de la OMS para el examen del semen humano y de la interacción entre el semen y el moco cervical. Cambridge University Press, 1987. 80p.
5. Normatização dos trabalhos científicos do curso de graduação em medicina. Resolução no. 001 / 97 do colegiado do curso de graduação em medicina da Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 1997.
6. International Committee of Medical Journal Editors. Uniforme requeriments for manuscripts submitted to biomedical journal. Ann Intern Med 1997: 126:36-47.

## RESUMO

Experimentalmente, tentativas de medir a função exócrina testicular, principalmente em ratos, tem resultado em uma diversificação de métodos. A função exócrina do testículo caracteriza-se pela espermatogênese, principal fator responsável pela reprodução. Essa função pode ser avaliada por métodos diretos e indiretos. Como no homem o parâmetro mais comum de avaliação desta função, é através do espermograma, necessita-se obter um método animal semelhante, possibilitando alguma correlação clínico-experimental. O presente estudo busca verificar o valor da técnica de microaspiração do esperma para o estudo dos valores seminais do rato. Foi utilizado um único grupo de 35 ratos albinos machos, adultos, da linhagem WISTAR. Utilizou-se a técnica de microaspiração de esperma da cauda do epidídimo do rato. Os dados referentes aos testículos direito e esquerdo de cada animal, segundo concentração e motilidade espermática, foram analisados pelo teste t de STUDENT para amostras dependentes, com  $\alpha = 0,05$ . A amostra distribuiu-se uniformemente, dentro da curva de distribuição esperada para o teste t de STUDENT. Não houve diferença significativa da concentração e da motilidade espermática, entre os testículos direito e esquerdo. Conclui-se que a técnica de microaspiração da cauda do epidídimo permite a obtenção do esperma do rato de forma prática e confiável.



## SUMMARY

Experimentally, attempts to measure the testicular exocrine function, mainly in rats, has resulted in a diversity of investigation methods. The exocrine function of testicle is characterized through spermatogenesis, main responsible factor by reproduction. This function may be appraised for direct and indirect methods. As in the man, the most common parameter of this function is through the seminal analyses, it is necessary to obtain a similar animal method, enabling any clinical and experimental correlation. The present study attempts to verify the value of sperm microaspiration technique to study of rats seminal values. It was utilized unique group of 35 male rats, adults, of the WISTAR lineage, with 150 days of age. It has been utilized sperm microaspiration technique from the rats epididymis tail. The data obtained from the right and left testis of each animal, according to sperm concentration and sperm motility, was analysed by the STUDENT t test for dependent samples, with  $\alpha = 0,05$ . The sample was situated uniform, within of the expected distribution bend for the STUDENT t test. There was not significantly difference of sperm concentration and of sperm motility, between the right and left testis. It is concluded, that the epididymis tail microaspiration technique allows to obtain the rat sperm in a practical and trustful pattern.

## APÊNDICE 1

### MICROASPIRAÇÃO DE ESPERMA DA CAUDA DO EPIDÍDIMO DO RATO

Data :

Número da Ficha :

Número do Rato :

Peso do Rato :

Tipo de Anestesia :

Quantidade Utilizada :

TESTÍCULO DIREITO		TESTÍCULO ESQUERDO	
Motilidade Espermática	%	Motilidade Espermática	%
Contagem Espermática		Contagem Espermática	
Peso Testicular	g	Peso Testicular	g

OBSERVAÇÕES :

## **ANEXO 1**

### **LEI FEDERAL N.º 6.638 de 8 de maio de 1979.**

**ESTABELECE NORMAS PARA A PRÁTICA DIDÁTICO-CIENTÍFICA DA VIVISSECÇÃO DE ANIMAIS E DETERMINA OUTRAS PROVIDÊNCIAS.**

#### **ART. 1.º**

Fica permitida, em todo o território nacional, a vivissecção de animais, nos termos desta Lei.

#### **ART. 2.º**

Os Biotérios e os Centros de Experiências e demonstrações com animais vivos deverão ser registrados em órgão competente e por ele autorizados a funcionar.

#### **ART. 3.º**

A vivissecção não será permitida:

- I - Sem o emprego de anestesia;
- II - Em Centros de Pesquisas e estudos não registrados em órgãos competentes;

- III – Sem a supervisão de técnico especializado;
- IV – Com animais que não tenham permanecido mais de 15 dias em Biotérios legalmente autorizados;
- V – Em estabelecimentos de ensino de primeiro e segundo graus e em quaisquer locais frequentados por menores de idade.

#### **ART. 4.º**

O animal só poderá ser submetido às intervenções recomendadas nos protocolos das experiências que constituem a pesquisa ou os programas de aprendizado cirúrgico quando, durante ou após a vivissecção, receber cuidados especiais.

- \* 1.º Quando houver indicação, o animal poderá ser submetido a eutanásia sob estrita obediência às prescrições científicas.
- \* 2.º Caso não sejam submetidos a eutanásia, os animais utilizados em experiência ou demonstrações somente poderão sair do Biotério trinta dias após a intervenção, desde que destinados a pessoas ou entidades idôneas que por eles queiram responsabilizar-se.

#### **ART. 5.º**

Os infratores desta Lei estão sujeitos:

- I – Às penalidades cominadas no artigo 64, caput, do Decreto Lei n.º 3.688 de 3.10.1941, no caso de ser a primeira infração;
- II – À interdição e cancelamento do registro do Biotério ou do Centro de Pesquisa, no caso de reincidência.

**ART. 6.º**

O Poder Executivo, no prazo de noventa dias, regulamentará à presente Lei, especificando:

- I – O Órgão competente para o registro e a expedição de autorização dos Biotérios e Centros de Experiências e demonstrações com animais vivos;
- II – As condições gerais exigíveis para o registro e o funcionamento dos Biotérios;
- III– Órgão e autoridades competentes para a fiscalização dos Biotérios e Centros mencionados no inciso I.

**ART. 7.º**

Esta Lei entrará em vigor na data da sua publicação.

**ART. 8.º**

Revogam-se as disposições em contrário.

## **ANEXO 2**

**COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (COBEA), entidade filiada ao INTERNATIONAL COUNCIL FOR LABORATORY ANIMAL SCIENCE (ICLAS), recomenda:**

### **OS PRINCÍPIOS ÉTICOS DA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL.**

#### **POSTULA-SE:**

##### **Artigo I**

Todas as pessoas que pratiquem experimentação biológica devem tomar consciência de que o animal é dotado de sensibilidade, memória e que sofre sem poder escapar à dor;

##### **Artigo II**

O experimentador é moralmente responsável por suas escolhas e por seus atos na experimentação animal;

### **Artigo III**

Procedimentos que envolvam animais devem prever e serem desenvolvidos considerando-se sua relevância para a saúde humana e animal, a aquisição de conhecimentos ou o bem da sociedade;

### **Artigo IV**

Os animais selecionados para um experimento devem ser de espécie e qualidade apropriadas e apresentar boas condições de saúde , utilizando-se o número mínimo necessário para se obter resultados válidos. Ter em mente a utilização de métodos alternativos tais como modelos matemáticos, simulação por computador e sistemas biológicos *In Vitro*;

### **Artigo V**

É imperativo que se utilizem animais de maneira adequada, incluindo aí evitar o desconforto, angústia e dor. Os investigadores devem considerar que os processos determinantes de dor ou angústia em seres humanos, causam o mesmo em outras espécies.

### **Artigo VI**

Todos os procedimentos com animais que possam causar dor ou angústia precisam se desenvolver com sedação, analgesia ou anestesia adequada. Atos cirúrgicos ou outros atos dolorosos não podem se implementar em animais não anestesiados e que estejam apenas paralisados por agentes químicos e/ou físicos.

## **Artigo VII**

Os animais que sofram dor ou angústia intensa ou crônica, que não possam se aliviar e os que não serão utilizados, devem sofrer eutanásia por método indolor e que não cause sofrimento ou estresse;

## **Artigo VIII**

A utilização de animais em procedimentos didáticos e experimentais pressupõe a disponibilidade de alojamento que proporcione condições de vida adequada às espécies, contribuindo para sua saúde e conforto. O transporte, a acomodação, a alimentação e os cuidados com os animais criados ou utilizados para fins biomédicos devem ser dispensados por técnico qualificado (veterinário).

## **Artigo IX**

Os investigadores e funcionários devem ter qualificação e experiência adequadas para exercer procedimentos em animais vivos. Deve-se criar condições para seu treinamento no trabalho, incluindo aspectos de trato e uso humanitário dos animais de laboratório.

O conteúdo destes artigos encerra três princípios básicos:

- sensibilidade, bom senso, boa ciência.



**TCC  
UFSC  
CC  
0206**

**Ex.1**

N.Cham. TCC UFSC CC 0206

Autor: Lima, Eduardo Arna

Título: ParâmetDa Rosseminais para avali



972806050

Ac. 253028

Ex.1 UFSC BSCCSM